

⑩ 日本国特許庁 (JP)

⑪ 特許出願公表

⑫ 公表特許公報 (A)

平4-501056

⑬ Int. Cl.
C 12 P 21/02識別記号
B 8214-4B審査請求未請求
予備審査請求有
部門(区分) 1 (1)

⑭ 公表 平成4年(1992)2月27日

(全 18 頁)

⑮ 発明の名称 ジペプチドまたは構造関連化合物の酵素的製造方法

⑯ 特願 平1-508952

⑯ 翻訳文提出日 平3(1991)2月8日

⑯ 出願 平1(1989)8月14日

⑯ 国際出願 PCT/DK89/00193

優先権主張 ⑯ 1988年8月12日 ⑯ デンマーク(DK) ⑯ 4521/88

⑯ 国際公開番号 WO90/01555

⑰ 発明者 アースムル - オルセン, ス デンマーク国ディーケイ - 2942 スコツズボルグ, スト. ティ
ライツ

⑯ 国際公開日 平2(1990)2月22日

⑰ 発明者 ソルベツク, ピア デンマーク国ディーケイ - 2970 ホールショルム, スドル. ヤ
ツグトベユ 39⑯ 出願人 カールバイオテック リミテッド アクティゼルスカブ デンマーク国 ディケイ - 2200 コペンハーゲン エヌ. タゲ
ンスベユ 16⑯ 代理人 弁理士 浅村皓 外3名
⑯ 指定国 AU, DK, FI, HU, JP, US

最終頁に続く

請求の範囲

1. 一般式



(式中、Aは側鎖が保護されていてもよいしーもしくはD-α-アミノ酸残基またはD-アミノ酸残基であり、BはAと同様もしくは異様の側鎖が保護されていてもよいしーもしくはD-α-アミノカルボン酸残基、およびL-もしくはD-アミノリン酸残基またはL-もしくはD-アミノスルホン酸残基、または相当するD-アミノ酸、またはそれらの塩もしくは水和物であり、YはOH、H、アルキル、アリール、アラールキルまたはC-末端保護基であるか、あるいはBYは



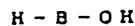
(式中、B'はBに関する定義されたアミノカルボン酸のデカルボキシ誘導体であり、Y'はH、アルキル、アリールまたはアラールキルである)で示されるアミノアルコール残基を含む)を有するジペプチドまたは構造的に類似の化合物を製造するにあたり、式



(式中、Aは上に定義したとおりであり、R'は不活性置換基で置換されていてもよいアルキル、アリールもしくはアラール基であるかまたはアミノ酸のα-deest-

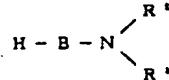
アミノフラグメントであり、R'およびR'は互いに同種または異種でありそれぞれ水素または不活性置換基で置換されていてもよいアルキル、アリールもしくはアラールキル基である)を有するアミノ酸誘導体である基質成分を、

(a) 式



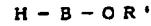
(式中、Bは上に定義したようにアミノカルボン酸残基である)を有するアミノ酸、

(b) 式



(式中、Bは上に定義したようにアミノカルボン酸残基であり、R'およびR'は、R'が水素である場合にはR'はヒドロキシまたはアミノでもよいことを除いて、上記の意味を有する)を有するアミノ酸アミド、

(c) 式



(式中、Bは上に定義したようにアミノカルボン酸残基であり、R'はアルキル、アリールまたはアラールキルである)を有するアミノ酸エステル、

(d) 式



特表平4-501056(2)

(式中、R¹、R²およびR³はそれぞれ独立に水素、アルキル、アリールまたはアラールキルであり、Xは1～6、Zは2～12である)を有する、側基が保護されていてもよい直鎖状または分岐状アミノホスホン酸またはアミノスルホン酸、

(a) 式



(式中、B¹は上に定義した通りであり、Y¹はOまたはその官能性誘導体、好ましくはケタールであり、R¹はH、アルキル、アリールまたはアラールキルである)を有するアミノ酸アルデヒドもしくはケトンまたはそれらの誘導体、および式



(式中、B¹およびY¹は上記の意味を有する)を有するアミノアルコールから選ばれる求核試薬成分と、セリンまたはチオールカルボキシペプチダーゼとは異なるアミダーゼまたはエステラーゼの溶液または分離液としての存在下に反応させ、ついで所望により存在する側鎖保護基もしくは保護基Yの切断および/または、所望により導かれたジペプチドの塩もしくは水和物への変換を行う方法

2. セリンまたはチオールプロテアーゼ、リバーゼ、エステラーゼおよびグリコシダーゼから選ばれるエステラーゼまたはアミダーゼ活性を有する酵素を使用する請求項1記載の方法

3. 使用する酵素は化学的に修飾されているかまたは天然型の合成的変異体である請求項1または2記載の方法

4. 固定化を使用する請求項1～3のいずれかに記載の方法

5. 0～90%好ましくは0～80%の極性水溶和性有機溶媒を含有し、pH値3～11、好ましくは5～10、5、さらに好ましくは6～10、とくに7～9、5を有する水性反応溶液を用いる請求項1～4のいずれかに記載の方法

6. 有機溶媒はアルカノール、ジメチルスルホキシド、ジメチルホルムアミド、ジメトキシエタンおよびエチレングリコールから選ばれる請求項5記載の方法

7. 0～10%の水を含有する有機反応溶液または分散液を使用する請求項1～4のいずれかに記載の方法

8. 好ましくはジアルキルエーテル、酢酸エチル、ブロピオン酸エチル、オクタン、ヘプタン、ヘキサン、石油エーテルおよびメチレンクロリドから選ばれる非極性有機溶媒を用いる請求項7記載の方法

9. 有機溶媒としても働く液体基質または求核試薬成分を使用する請求項7記載の方法

10. 基質成分として、不活性炭換基で置換されていてもよいベンジルエステルまたは直鎖状もしくは分岐状C₁～C₆アルキルエステルから選ばれるD-またはL-アミノ酸エステルを使用する請求項1～8のいずれかに記載の方法

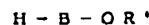
に記載の方法

11. 求核試薬成分として、式



(式中、R¹は水素またはC₁～C₆アルキルであり、BはL-またはD-アミノカルボン酸残基である)を有するアミノ酸アミドを使用する請求項1～10のいずれかに記載の方法

12. 求核試薬成分として、式



(式中、BはL-またはD-アミノカルボン酸残基であり、R¹はC₁～C₆アルキルである)を有するエステルを使用する請求項1～10のいずれかに記載の方法

13. 生成したジペプチドは1個または2個以上のC-末端保護基Yを包含し、これらの基の1個または2個以上を、それに先立つ反応に使用されたのと同一の酵素によりまたは異なるエステルもしくはアミド特異性を有する酵素により、酵素的に切断する請求項1～12のいずれかに記載の方法

14. 生成したジペプチドは1個または2個以上の側鎖保護基を包含し、これらの基の1個または2個以上を、好ましくはエステラーゼもしくはリバーゼまたは蛋白分解酵素により、酵素的に切断する請求項1～13のいずれかに記載の方法

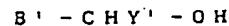
明細書

ジペプチドまたは構造関連化合物の酵素的製造方法

本発明は、一般式



(式中、Aは側鎖が保護されていてもよいL-もしくはD-α-アミノ酸残基またはD-β-アミノ酸残基であり、BはAと同様もしくは異種の側鎖が保護されていてもよいL-もしくはD-α-アミノカルボン酸残基、およびL-もしくはD-アミノリン酸残基またはL-もしくはD-アミノスルホン酸残基、または相当するD-アミノ酸、またはそれらの塩もしくは水和物であり、YはOH、H、アルキル、アリール、アラールキルまたはC-末端保護基であり、あるいはBYは



(式中、B¹はBに関連して定義されたアミノカルボン酸のデカルボキシ誘導体であり、Y¹はH、アルキル、アリールまたはアラールキルである)で示されるアミノアルコール残基を表す)を有するジペプチドおよびジペプチド誘導体の酵素的製造方法に関する。

最近、D-コンフィギュレーションのアミノ酸残基を含有していてもよいジペプチドおよびジペプチド誘導体に対する興味が、それらの薬理学的効果たとえば抗生物質作用の可能性に関連して高まってきている。同様に、

特表平4-501056(3)

費用および時間を増大させ、収率に悪影響を与える。

共通して用いられるアミノ保護基の代表的な例には、カルボベンゾキシ(Z-)および三級ブロキシカルボニル(Boc-)型の保護基があり、これらの分子量はアミノ酸基のそれに匹敵する。まず、保護基は、別個の反応工程で適当な高価な試薬により発発原料に導入し、ついで単離工程を行わねばならない。その存在時には、これらの疎水性の基が中間生成物および反応生成物の溶解度に著しく影響する場合が多く、それらの処理に必要な溶媒の性質および量の両者に、また精製および脱保護の容易さに問題を生じる。脱保護にも別個の工程を要し、ついで精製工程が必要になる。

この目的では一連の反応が利用できるが、接触水素化の場合を除いて、それ自身がまた工業的な問題を生じる。これらの方法は、激烈な、多くの場合強酸性または塩基性条件下に行われ、一連の副反応を生じ、不純な生成物を生成し、また複雑な精製が必要になることが多い。

この比較的長い一連の合成工程の最終工程は所望のペプチドを得るためにかなり複雑な脱保護であり、ほとんど不可避な二次反応によって、所望の高純度を有する生成物を提供するためにはかなりの労力を要する精製操作をしばしば必要とする。

最近とくに興味をひいているジペプチドには、甘味剤として広く使用されアスパルテームとも呼ばれるL-Asp-L-Phenylalanineメチルエステルおよびその誘導体が

ヒトならびに動物の人工栄養、甘味剤の分野で、また農薬などえば除草剤の分野でも、ジペプチドは著しい興味をもたれている。

このようなジペプチドH-A-B-Yは公知の化学的カップリング反応によって製造できるが、これらの方針はすべて、一般に、AおよびBに含まれるアミノ酸のアミノ基およびカルボン酸基をそれぞれ、また多くの場合、これらが側鎖に官能基ももつ場合には側鎖も、保護する必要があるという特徴をもっている。さらに、使用する試薬のために、化学的カップリング反応に際して副反応が起こる危険がついてまわり、主な副反応にはとくにA成分のラセミ化がある。化学的カップリング工程を、緩和な条件下に進行する酵素的カップリング工程に置換することによって、このような副反応およびラセミ化は回避することができて、立体化学的に純粋な生成物が生成する。

アミノおよびカルボキシル保護基の存在は化学的カップリングにおいては必須であり、またエンドプロテアーゼを使用する従来技術での酵素的カップリングにおいても一般的に必須と考えられてきた。

これは、これらの方法の工業的規模での経済性に大きな悪影響を与えるいくつかの望ましくない特徴を付与し、これはジペプチド合成の場合とくに明白である。

この欠点は、これらの基の導入ならびにそれらの除去および処理操作時における存在によるもので、全過程の

ある。アスパルテームの化学的合成にも上述の欠点がある。

アスパルテームおよびその誘導体の製造に際してのアミノ末端の保護を回避する試みから、EP-A1-074095、EP-A2-102529およびEP-A2-154472に記載されている発酵法のような、微生物発酵によるアプローチが生まれている。この方法は、合成的アプローチとは基本的に異なり、アスパルテームに特異的な生物体によるものである。したがって、一般的に他のジペプチドに開拓して通用できるものではない。さらに、収率は低く、発酵培地からの回収には労力を要する。

アスパルテームの既知の製造方法における上述の短所はEP-A2-289380に述べられている。この出版には、培地中でL-アスパラギン酸α-エステルまたはL-アスパラギン酸β-アミドをL-フェニルアラニンアルキルエ斯特ルと、酵素、その酵素を含有する微生物、微生物の酵素含有分画、または固体支持体上に固定化された酵素の存在下に反応させるL-Asp-L-Phenylalanineアルキルエ斯特ルが請求されている。この酵素は、L-アスパラギン酸α-エ斯特ルまたはL-アスパラギン酸β-アミドとL-フェニルアラニンアルキルエ斯特ルの結合によりL-アスパルチル-L-フェニルアラニンアルキルエ斯特ルを生成できるものである。

L-Aspに対して特異的なエステラーゼまたはアミダーゼ

活性を有するがPhenに対しては活性を示さない酵素を使用しなければならないことが認められる。挙げられている唯一の酵素はStaphylococcus aureus V8のエステル分解活性をもつ細胞外プロテアーゼである。

したがって、N-保護もしくはD-エステルまたはアミドとともに、N-α-非保護Asp-エステルまたはアミドの適用可能なことが示唆されているが、特定のペプチドの製造に使用される1種の特異的酵素の開示は、かなり独特な反応条件、すなわち5倍過剰の基質成分が用いられた1つの実施例によって支持されているのみで、この旨及ばず、アミダーゼまたはエステラーゼ酵素によって触媒されるジペプチド合成におけるN-非保護基質成分の適用可能性の一般的教示を提供するものとは到底いふことができない。

すなわち、アミノおよびカルボキシ末端両者の保護基の回収を可能にすることは、全過程の経済性という意味で明らかに有利である。側鎖に保護基をもつが末端には保護基をもたないジペプチドを製造できることに興味がもたれる場合もあり、それは、側鎖は保護されているがアミノ基は保護されていない発発原料に出発する本発明の方針において示される。この場合、緩和な反応条件と全過程の経済性の同じ利点が得られる。所望により、側鎖保護基は、一般的に、アミノ保護基の場合よりも緩和な条件下に、化学的または酵素的手段で除去できる。

側鎖が保護されていなくてもよいアミノ酸誘導体とC

特表平4-501056(4)

のオリゴマー化を抑制できたことが見出された。

ある種のエンドプロテアーゼがレーコンフィギュレーションのある種のN-非保護アミノ酸エステルのオリゴマー化を触媒できることは以前から知られていた通りであるが(Pruzon, J. S.: *Advances in Enzymology*, 53: 239~308, 1982)、これを単純なダイマーではないジペプチドの製造に使用する試みはこれまでにはなかった。一般に、このようなオリゴマー化の結果は一連のオリゴマー、場合によっては長いオリゴマーの混合物であった。オリゴマーの程度および混合物の複雑さは形成される生成物の溶解度に依存する。また、与えられた酵素が特定のN- α -非保護アミノ酸誘導体を加水分解できれば、それが直ちに同じ誘導体が関与するカッティング反応を常に触媒できるというものではないことも留意すべきである(Anderson, A. J.: "Peptides, Structure and Function", Proc. of the ninth ann. peptide symposium, Deber, C.W.ら編, Pierce, 1985年, 355頁によって引用された文献参照)。

この理由から、ペプチド合成に対するセリンおよびチオールエンドプロテアーゼの使用は、たとえばハバイン、ステムプロメレン、フィシン、キモババインおよびキモトリプシンが挙げられているUS-A-4,088,136に例示されているように、アミノおよびカルボキシ末端保護出発原料に限られていた。

さらに、これらの酵素に対しては、Y. W. Mitio ら

一末端が保護されていない限りアミノ成分(求核試薬)の使用が可能な酵素触媒カッティング反応も知られている。たとえば、DK特許明細書第155613号ならびに相当するEP特許明細書第17485号(EP-B1-17485)に記載されている。この記載は参考として本明細書に導入する。

略述すれば、EP-B1-17485には、一般にアミノ酸エステルおよびアミノ酸アミドから選ばれる基質成分を、一般にL-アミノ酸アミド、L-アミノ酸またはL-アミノ酸エステルから選ばれるアミン成分(求核試薬)と、L-特異的セリンまたはチオールカルボキシペプチダーゼ酵素の存在下に反応させることによりペプチドを製造する方法が記載されている。

EP-B1-17485の方法によってジペプチドを製造しようとする場合には、基質成分はN-末端保護アミノ酸誘導体であることが必須であり、構成成分アミノ酸はL-アミノ酸であることが必須である。

EP-A1-278787(参考として導入)および1987年2月13日出願のDK出願725/87から優先権を主張している他の出願に記載されているように、EP-B1-17485に用いられるセリンおよびチオールカルボキシペプチダーゼはジペプチドおよびジペプチド誘導体の合成のための制御された反応において、驚くべきことに、基質成分としてN-非保護アミノ酸エステルまたはアミドの利用を可能にすること、また基質

(Int. J. Peptide Protein Res., 23: 528~534, 1984)も述べているように、これまで一般的に、遊離アミノ酸はアミノ成分として不適当と考えられてきた。

上述のアミノおよびカルボキシ末端保護出発原料はまた、US-A-3,972,773に例示されているようにアスパラギン酸エンドプロテアーゼたとえばペプシンを使用する場合、EP-A1-008585に乙-Asp-PheOMe, Phe-OMe-塩の合成によって例示されているようにメタクロエンドプロテアーゼを使用する場合にも必須である。

アミノおよびカルボキシ末端保護出発原料の使用は、非プロテアーゼたとえばアミダーゼ活性をもつエステラーゼについても必須と考えられていた。Blair Westら(Tetrahedron Letters, 28(15): 1629~32, 1987)による、水性溶媒液を含んでいてもよい有機媒体中のブタ臍リバーゼ、Candida cylindracea リバーゼおよびブタ肝エステラーゼの使用例がある。

一方、セルラーは、Kitazume, T. ら(J. Flourine Chem., 38: 225~236, 1987)によって記載されているように、これまで、完全に遊離の β -アミノ酸の重合縮合型反応に合成的に使用されたことがあるにすぎない。

アミノ非保護基質成分からのDL, LDおよびDD-コンフィギュレーションのジアステロマー-ジペプチ

ドならびに β -アミノ酸残基を含むペプチドの合成は、これまで、EP-A1-278787関連の記載を除くカルボキシペプチダーゼまたは一般に蛋白分解酵素(EC 3, 4群)では不可能であった。EP-A1-088053に示されているように、別の群の酵素、アミノアシル-t-RNAシンターゼ(EC 6, 1群)用いる試みも行われてきたが、この場合には各種類のアミノ酸残基について特異的な酵素を使用せねばならず、しかもATPのような高価な補因子を必要とする。同時に、収率もさわめて低く、ある程度の生成物は準難、固定されるものの、通常10倍過剰の補因子および100倍過剰の求核試薬、また量まで1000倍過剰までの酵素を必要とした。

Gaertnerらの最近の研究(Proteins: Structure, Function and Genetics, 3: 130~137, 1988)では、酵素的ペプチド合成における基質成分としてN- α -非保護アミノ酸を使用することに対する偏見を間接的に確認している。初期に遭遇した大きな問題は新たに合成された生成物の二次的加水分解であることから、有機溶媒の使用により反応媒体中の水の活性を低下させる試みが行われた。Gaertnerらは、有機媒体中への溶解度を上昇させるために化学的に修饰されたキモトリプシンを用いてジペプチド合成法を報告しているのである。多数の基質としてのN- α -保護アミノ酸エステルと求核試薬としてのアミノ酸アミドを用い、ベンゼン媒体中

特表平4-501056(5)

で、 $N-\alpha$ -保護ジペプチドが好収率で得られた。すなわち、 α -Bz-Lys-Phe-NH₂は、 α -Bz-Lys-OMeをPhe-NH₂と反応させることにより、88%以上の収率で得られた。しかしながら ϵ -Z-Lys-OEt、すなわち側鎖は保護されているが $N-\alpha$ -非保護リシンエステルを用いた場合には、 ϵ -Z-Lys-Phe-NH₂は生成しなかった。この結果についてGaertnerらは意見を述べていないが、基質成分のアミノ基保護が必須と考えていることは明白である。

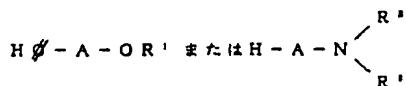
EP-AI-278787の発明をさらに発展させた本発明は、ジペプチドおよびジペプチド誘導体の合成のための制御された反応における基質成分の $N-\alpha$ -非保護アミノ酸エステルおよびアミドの利用可能性がセリンまたはチオールカルボキシペプチダーゼに限られるものではなく、一般にアミダーゼまたはエステラーゼ、とくにセリンエンドプロテアーゼ、チオールエンドプロテアーゼ、リバーゼおよびエステラーゼによっても可能であるという驚くべき所見に基づくものである。

さらに、驚くべきことに、これらの反応における基質としてはD-コンフィギュレーションのN- α -非保護アミノ酸誘導体も使用でき、したがってL-ジペプチドのほかにDL-ジペプチドも合成できることが見出された。しかしながら、D-基質についての反応速度は一般に、均一条件下では、L-基質についての反応速度よ

りも若干低いが、D-基質がL-基質についての速度よりはるかに低い速度で反応する相当するN-保護アミノ酸エステルの場合(Purdieら: Biochem. Biophys. Acta, 268: 523, 1972)よりも速度差ははるかに小さい。しかしながら、この点に関しては酵素間には大きな個体差がある。合成収率は非保護L-基質の場合と同様に非保護D-基質でも高いことが多い。

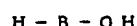
ある種のエンドプロテアーゼが、N-保護基質成分との反応においてD-コンフィギュレーションを有する求核試薬成分を利用できることは知られている。すなわち、本発明の方法によれば、実際の配列に応じて、L- β -、DL-、LD-またはDD-コンフィギュレーションを有するジペプチドを合成することが可能である。

すなわち、本発明の方法は、式

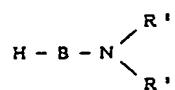


(式中、Aは先に定義した通りで、R'は不活性置換基で置換されていてもよいアルキル、アリールもしくはアラール基、またはアミノ酸の α -de β -アミノフランメントであり、R'およびR'は互いに同種または異種であってそれぞれ水素または不活性置換基で置換されていてもよいアルキル、アリールもしくはアラールキル基である)を有するアミノ酸誘導体である基質成分を、

(a) 式



(式中、Bは先に定義したようにアミノカルボン酸残基である)を有するアミノ酸、(b) 式



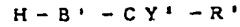
(式中、Bは先に定義したようにアミノカルボン酸残基であり、R'およびR'は上述の意味を有するが、R'が水素である場合にはR'はヒドロキシまたはアミノであってもよい)を有するアミノ酸アミド、(c) 式



(式中、Bは先に定義したようにアミノカルボン酸残基であり、R'はアルキル、アリールまたはアラールキルである)を有するアミノ酸エステル、(d) 式



(式中、R'、R'およびR'はそれぞれ独立に水素、アルキルまたはアラールキルを表し、xは1~6、zは2~12である)を有する酸基が保護されていてもよい直鎖状または分岐状アミノホスホン酸またはアミノスルホン酸、(e) 式



(式中、B'は先に定義した通りであり、Y'はOまたはその官能性誘導体、好ましくはケタールであり、R'はH、アルキル、アリールまたはアラールキルである)

を有するアミノ酸アルデヒドもしくはケトンまたはその誘導体、および(f) 式



(式中、B'およびY'は上述の意味を有する)を有するアミノアルコールから選ばれる求核試薬成分と、セリンまたはチオールカルボキシペプチダーゼとは異なるアミダーゼまたはエステラーゼの溶液または分散液としての存在下に反応させ、ついで所望により存在する側鎖保護基もしくは保護基Yを切断し、および/または、得られたジペプチド誘導体を所望により塩または水和物に変換することを特徴とする。

有用なアミノ酸の例には、脂肪族アミノ酸、たとえばグリシン(Gly)、アラニン(Ala)、バリン(Val)、ノルバリン(Nva)、ロイシン(Ieu)、イソロイシン(Iso-Leu)およびノルロイシン(Nleu)のようなモノアミノモノカルボン酸、セリン(Ser)、スレオニン(Thr)およびホモセリン(homo-Ser)のようなヒドロキシアミノ酸、メチオニン(Met)またはシステイン(Cys-S)およびシステイン(Cys-H)のような含硫アミノ酸、アスパラギン酸(Asp)、グルタミン酸(Glu)ならびにそれらのアミドたとえばアスパラギン(Asn)およびグルタミン(Gln)のようなモノアミノジカルボン酸、オルニチン(Oun)、リジン(Lys)およびアルギニン(Arg)のようなジアミ

特表平4-501056(6)

ノモノカルボン酸、フェニルアラニン(Phe)およびチロシン(Tyr)のような芳香族アミノ酸、ヒスチジン(His)、プロリン(Pro)およびトリプトファン(Trp)のような異環環アミノ酸が含まれる。もっと異例の構造をもつ有用なアミノ化合物の例としては、ペニシラミン(Pen)、アラニンホスホン酸(AlaP)のようなアミノホスホン酸、タウリン(Tau)のようなアミノスルホン酸、 β -アラニン(BAla)のような ω -アミノ酸、 α -メチルアラニン(A1b)のようなイソアミノ酸、不活性置換基たとえばハロゲンもしくはニトロで置換されたアミノ酸、またはたとえばアラニンから誘導されるアルデヒド、ケトン、ケタールもしくはアルコールを挙げることができる。すでに述べたように、これらは基質成分中にD-型として含まれてもよく、また求核試薬成分中にD-型で存在してもよい。

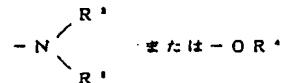
式H-A-B-Yのペプチド誘導体中の基Yについて与えられた定義は、「請求項1」に記載された様々な求核試薬成分に反映している。すなわち、(b)および(c)両者はC-末端保護基を含有し、一方、Y=Hはアミノ酸アルデヒドに、Y=アルキル、アリールまたはアラルキルはアミノケトンに相当する。所望により、アミノケトンの誘導体たとえばケタール、オキシムまたはサルファイトを求核試薬として用いることもできる。

EP-A 1-278787の方法の場合のように、上

述の公知方法に対する本発明の方法の利点は、側鎖の保護が最小限または不要なこと、D-およびL-コンフィギュレーションのいずれでもよい基質成分のN-保護が不要なこと、ラセミ化の危険がないこと、合成工程が少なくてよいこと、および期待される比較的純粋な最終生成物が得られることであり、これらの組合せにより著しく簡単かつ経済的な製造方法が提供される。

好ましい基質成分は、R'が1~8個の炭素原子を有する直鎖状または分岐状のアルキルであるエステル、たとえばメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、三根ブチル、アミル、ヘキシリ、ヘプチルおよびオクチル、またはアラールキル基、ベンジルである。とくに適当な求核試薬成分は、R'がHでR'がHもしくはC₁~C₄アルキルであるアミノ酸アミド、またはR'が上述したような炭素原子1~8個を有する直鎖状もしくは分岐状のアルキルであるアミノ酸エ斯特ルである。上述のように、R'は不活性置換基たとえばヒドロキシまたはニトロで置換されていてもよいアルキル、アリールまたはアラールキル基であってもよい。

本発明はまた、基



を含有するペプチドを中間体を形成し、ついでこの基を切断してカルボン酸基を形成させる方法をも包含する。

この切断は、他の酵素、または反応条件は通ってもペプチドの生成に使用したのと同じ酵素によって触媒させることができる。基YのC-末端の修飾も可能である。

酵素はまた、側鎖保護基の切断にも使用できる。適用可能な酵素はその保護基の性質に応じて、蛋白分解酵素、リバーゼおよびエステラーゼである(“The Peptides. Analysis. Synthesis. Biology”, 第9巻, Special Methods in peptide Synthesis Part C. J. A. Glass, Enzymatic manipulation of Protecting Groups in Peptide Synthesis, Academic Press, 1987参照)。

エステラーゼおよび/またはアミダーゼ活性をもち、したがって本発明の方法における触媒としての活性が期待できる酵素の例としては、以下の表に掲げた酵素がある。

これらの酵素の詳細については、とくに、Perlmann, G. E. ら: Colowick, S. P. & Kaplan, N. O. 編, Methods of Enzym., 8 (1966), 19 (1970), 28 (1972), 35 (1975) および 45 (1976), Fruton, S.: Adv. Enzymol., 53: 239頁, Wiley (1982), Abassi, A. ら: Biol. Chem., Hoppe-Seyler, 307: 441~45頁 (1986), Dixon, M. & Webb, B. C.: “Enzymes”, 第3版, Longman Group (1979), Torrey, S. 編: “Enzyme Technology, Recent Advances”, Biotech. Rev., 2: Noyes Data Corporation (1983), さらに Laane,

C. Tramper, S., Lilly, W. D. 編: “Biocatalysis in Organic Media”, Elsevier (1987), Asano, Y. ら: Angew. Chem., 101: 511~512頁 (1989), Kitazume, T. ら: J. Fluorine Chem., 36: 225~236頁 (1987) の記載が参考になる。これらの記載はすべて参考として本明細書に導入する。

表 I

I. カルボキシペプチダーゼ以外のプロテアーゼ

	酵素(略号)	通常の起源
A) チオール	ハバイン(P)	ババイヤ
エンドプロ	キモババイン(GP)	ババイヤ
テアーゼ:	プロモライン(B)	バインアップル
	フィシン(F)	イチジク(Picus)
	クロストリバイン	Clostridium
	(CL)	histolyticum

B) セリンエン	トリプシン(T)	脾臓
ドプロテア	キモトリプシン	
ニゼ:	(CT)	脾臓
	エラスター(E)	脾臓
	ズブチリシン(S)	Bacillus licheniformis または subtilis
	テルミターゼ(TV)	Termeactinomyces

プロテナーゼ K (K)	vulgaris Tritirachium albus	(E.C. 3.1.1.2) トリアルギセロリバーゼ	血漿 動物、野菜
パリルーブロテ ナーゼ (V P)	Candida tropicalis	(E.C. 3.1.1.3) とくに ブタ脾臓または <i>Candida cylindracea</i>	または微生物
ポストプロリン 特異的	<i>Flavobacterium</i>	または Lipolase™ (NOVO): (<i>Aspergillus</i> sp.)	
エンドペプチダ ーゼ (PPSE)	meningosepticum	酵酸エステルアセチルエステラーゼ (E.C. 3.1.1.6)	動物組織
Achromobacter lyticus ブロテ ナーゼ (AL-L)	Achromobacter lyticus	アリールグリセロールリバーゼ (E.C. 3.1.1.23)	動物または野菜
エンドプロテナ ーゼ ArgCC(AO)	Submaxillaris glands	<u>III. グリコシダーゼ</u>	
エンドプロテナ ーゼ LysCC(LC)	Lysobacter enzymogenes	セルラーゼ (E.C. 3.2.1.4) 動物、野菜または とくに <i>Trichoderma viride</i> または <i>Aspergillus niger</i> 起源	微生物
トロンビン (TB)	血漿		
<u>C) エキソペプ チダーゼ:</u>	アミノペプチダ ーゼ (EC 3.4.1.1)	動物、野菜または とくに <i>Achromo-</i> <i>bacter</i> sp. 起源	微生物
<u>II. エステル結合に作用する他のヒドロラーゼ</u>			
カルボキシエステラーゼ (E.C. 3.1.1.1)	肝臓		
アリールヒドロラーゼ			

で好ましくは 60%までを含有してもよい媒体中で行われる。好ましい溶媒は、低級アルコール、ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、ジメトキシエタンおよびエチレングリコールである。

反応混合物中の pH はかなり一定の値に維持することが重要である。この pH 値は 3~11、好ましくは 5~10.5、さらに好ましくは 8~10、最も好ましくは 7~9.5 であり、また具体的な出発原料、生成するペプチドおよび酵素に依存する。

反応は別法として、水非混和性有機溶媒、たとえばベンゼン、トルエン、ヘキサン、ヘプタン、オクタン、ジアルキルエーテル、酢酸エチル、ブロピオン酸エチルおよびメチレンクロリド等からなる非水、非極性媒体中でも実施できる。これらの溶媒はエステラーゼおよび/またはアミダーゼ活性を有する酵素とくにリバーゼと適合性を有する。

これらの本質的に非極性の反応媒体には、至適な酵素の働きまたは反応安定性を促進するために、10%までの水を溶解型で含有させることができる。

反応温度は室温およびそれ以上、20~50°C が好ましいが、0~80°C の範囲の温度もその条件下に他の利点があれば使用できる。高濃度条件では、冰点下または 80°C 以上の温度も使用できる。

2種類の反応成分の濃度は広範囲に変動させることができるが、求核試薬成分がしばしば過剰に用いられ、ま

現時点で好ましい酵素はトリプシン、キモトリプシン、ズブチリシン、エラスター、パパイン、キモパパイン、クロストリパイン、ブタ脾臓リバーゼおよび *Candida cylindracea* リバーゼである。

使用される酵素は、化学的に修飾されてもよく、また天然型の合成型の変異体であってもよい。

以下にさらに詳細に説明するように、本発明の方法はかなり単純である。

反応は水性反応媒体中、所望により、水混和性で特定の条件下に酵素と適合性を有する医薬有機溶媒 90%ま

た基質成分のオリゴマー化を回避するために上記成分は全反応速頃時にわたり間隔をおいて少量ずつ添加されることが多い。酵素に対して良好な求核試薬を大過剰に使用すれば、驚くべきことにオリゴマー化は全く認められず、高基質濃度を副反応を生じることなく使用できる。A = B のホモジペプチドを所望の場合には、基質および求核試薬成分に別のカルボキシ保護基を用いることによって单一の求核試薬のオリゴマー化を回避できる。

したがって、基質成分の開始濃度は通常 0.005~2 モルであり、求核試薬成分については、別個に添加される場合、0.005~3 モルである。大抵の場合、過剰の求核試薬成分および基質成分からの加水分解生成物は回収可能で、所望により再エステル化および再使用ができる。両成分の再循環は、それらの構造が簡単で、また副反応および脱保護による損失がないので、とくに容易である。

酵素濃度も同様に変動させることができるが、N-保護アミノ酸基質を用いる場合に適当な濃度よりも若干高く (5~50 μm、またはさらに高濃度、約 500 μm まで) することが多い。しかし、合成の目的での所要量は、安定な固定化酵素プレバレーションを用い、したがって連続過屈で酵素を使用できる場合には、10 倍以上減少させることができる。

反応媒体には、酵素の基質への結合に影響した酵素を安定化する塩たとえば NaCl および CaCl₂、な

特表平4-501056 (8)

らびに存在する金属イオンに対する錯体結合剤を含有させることもでき、また、たとえばチオールエンドペプチダーゼにはメルカブト安定化剤たとえばDTT、BMEまたはシステインを使用できる。

この篇くべき加水分解連鎖の結果は、様々な酵素を用いた本発明の方法による様々なジペプチドの製造を例示する以下の実施例に示す通りである。

例1～13および20以下の一般的方法

反応は、反応量1mlの分析的規模により、pHスタット中で実施し、個々の例について条件を指示した有機溶媒の高含量または固体化酵素の使用例を除き、選択されたpH値は1N NaOHの自動添加によって一定に保持された。反応温度はとくに指示のない限り室温である。表には、反応温度、有機溶媒含量、生成物および収率も包含する。反応時間は通常0、5～5時間、とくに指示のない限り、酵素濃度は通常5～20μMである。

生成物の確認および生成物の収率の決定はC₁₈NOVA PAKカラム(Waters, RCW)上、50mMトリエチルアミノウムリン酸、pH3.0、0%～80%アセトニトリル含有の適当な勾配溶出系を用い、流速2ml/分の逆相HPLC(Waters 6000Aポンプ、660勾配ブレンダー、UK6インジェクター)によって実施した。溶出は230nm、254nm、278nmまたは280nmでUK検出器(Waters 480)によってモニタリングした。

様々な濃度で用いるL-レジペプチドのトリプシン+触媒合成

求核試薬	(M)	生成物	収率
ロイシングアミド	(0.2M)	ArgLeuNH ₂	20%
ロイシングアミド	(0.7M)	ArgLeuNH ₂	32%
メチオニンアミド	(0.25M)	ArgMetNH ₂	31%
メチオニンアミド	(0.5M)	ArgMetNH ₂	52%
メチオニンアミド	(1.0M)	ArgMetNH ₂	90%
セリンアミド	(0.5M)	ArgSerNH ₂	45%
チロシンアミド	(0.5M)	ArgTyrNH ₂	48%

a) 10μM

例2

基質としてL-またはD-アルギニンエチルエステル(50mM)と、求核試薬としてL-またはD-ロイシンおよびメチオニンアミドを用いるpH8.5の水中でのL-およびD-L-レジペプチドアミドジアステレオマーのトリプシン+触媒合成

基質	求核試薬	(M)	生成物	収率
D-ArgOEt	L-ロイシングアミド	(0.2M)	ArgLeuNH ₂	20%
D-ArgOEt	L-ロイシングアミド	(1.0M)	ArgLeuNH ₂	30%
D-ArgOEt	L-メチオニンアミド	(0.5M)	ArgMetNH ₂	68%
L-ArgOEt	D-メチオニンアミド	(1.0M)	ArgMetNH ₂	5%

a) 10μM

特表平4-501056 (8)

生成物は、HPLC分析からの推定される生成物ピークに相当する分画のアミノ酸分析および/または化学的に合成した標品とのHPLC比較によって同定した。これらの標品は既知の原理に基づく。通常は、BOC-A-O-Su、基質アミノ酸の三級プロテオキシカルボニルースクシニックイミドエステル誘導体と使用される求核試薬成分との間の反応を用い、ついで求核アミノ酸残基の脱保護によって製造された。いずれの場合も、ジアステレオマー-D,L-およびL,D-ジペプチド生成物からL-およびD,D-ジペプチドを分離することが可能であった。

230nmでのみ検出できる生成物については、生成物の収率は、化学的に合成された標品化合物の吸収/濃度曲線によって決定した。他の生成物については、収率は、関連波長での生成物および反応原料の吸収に相当する溶出クロマトグラムのピーク下液分面積間の比に基づいて決定された。

製造例14～17の反応条件は個々の例に記載する。反応は記載したように分析HPLCで追跡した。酵素濃度は、相当する分析例の場合よりも一般に低く、反応時間は長くしてあるが、反応条件の至適化の試みは行われていない。

例3

求核試薬としてL-アミノ酸アミド(0.5M)および基質としてL-リジンまたはヒスチジンエチルエステル(50mM)を用いるpH8.5の水中でのL-レジペプチドのトリプシン+触媒合成

基質	求核試薬	生成物	収率
LysOEt	メチオニンアミド	LysMetNH ₂	81%
LysOEt	トリプトファンアミド	LysTrpNH ₂	32%
LysOEt	アラニンアミド	LysAlaNH ₂	5%
HisOEt	メチオニンアミド	HisMetNH ₂	0.2%

a) 10μM

例4

基質としてL-チロシンエチルエステル(50mM)および求核試薬としてL-アミノ酸アミドを用いる水中でのL-レジペプチドアミドのα-キモトリプシン+触媒合成

求核試薬	(M)	pH	生成物	収率
ロイシングアミド	(0.2M)	9.0	TyrLeuNH ₂	68%
アルギニンアミド	(0.4M)	8.5	TyrArgNH ₂	90%
セリンアミド	(0.4M)	8.5	TyrSerNH ₂	75%

a) 5μM

特表平4-501056(9)

例 5

基質として L-チロシンエチルエステル (5 mM) と求核試薬として D-アミノ酸アミドを用いる水中での L, D-ジペプチドの α -キモトリプシン β 触媒合成

求核試薬	(M)	pH	生成物	収率%
D-ロイシニアミド	(0.2M)	9.0	TyrLeuNH ₂	17%
D-イソロイシニアミド	(0.3M)	9.0	TyrIleNH ₂	23%
D-セリンアミド	(0.4M)	8.5	TyrSerNH ₂	35%
a) 5 μM				
b) 5 mM基質				

例 6

基質として D-チロシンエチルエステル (50 mM) と求核試薬として L-ロイシニアミドを用いる水中 pH 9.0 での D, L-ジペプチドの α -キモトリプシン触媒合成

求核試薬	(M)	生成物	収率%
L-ロイシニアミド	(0.2M)	D, L-TyrLeuNH ₂	40%
L-ロイシニアミド	(0.3M)	D, L-TyrLeuNH ₂	68%

- a) 50 μM酵素
- b) 100 μM酵素
- c) 長い間24時間一日単位

例 7

様々なアミノ酸エステル (50 mM) を基質として、L-またはD-アミノ酸エステル (0.8 M) またはアミドを求核試薬として用いる pH 8.5 での L, L-および L, D-ジペプチドアミドおよびエステルの α -キモトリプシン β 触媒合成

基質	求核試薬	溶媒	生成物	収率%
L-PheOEt	L-ArgNH ₂ *	水	PheArgNH ₂	82%
L-TyreOEt	L-SerOEt	水	TyrSerOEt	41%
L-TyreOBzI	L-SerOEt	30%DMF	TyrSerOEt	40%
L-TyreOBzI	L-SerOMe	30%DMF	TyrSerOMe	39%
L-TyreOBzI	D-SerOMe	30%DMF	TyreSerOMe	21%

a) 5 μM

b) 0.4M 求核試薬

c) 80% 变換において

d) 生成物の化学的不安定性により、これらの条件下 15~35% 量の加水分解/ジケトビペラジン生成が認められたが、これは記録された収率には含まれていない。

例 8

L-アスパルチルジエステル (0.1 M) を基質として、D-アラニニアミドを求核試薬として用いる pH 8.5 での側鎖保護 L-アスパルチル-D-アラニルアミドのズブチシン β 触媒合成

基質	求核試薬	溶媒	生成物	収率
L-Asp(OEt) ₂	(1.0M)	水	Asp(OEt) ₂ alNH ₂	0%
L-Asp(OEt) ₂	(2.0M)	水	Asp(OEt) ₂ alNH ₂	24%
L-Asp(OEt) ₂ **	(0.5M)	30%DMF	Asp(OEt) ₂ alNH ₂	3%
L-Asp(OEt) ₂ **	(1.0M)	30%DMF	Asp(OEt) ₂ alNH ₂	20%

a) 5 μM

b) 50 μM基質、20 μM酵素

例 9

基質としてアミノ酸ベンジルエステル (50 mM) および求核試薬としてアミノ酸アミド (0.5 M) を用いる pH 8.5 における水中での L, L-アミドのエラスター β 触媒合成

基質	求核試薬	生成物	収率
L-ValOBzI	L-アルギニニアミド	ValArgNH ₂	59%

* 4.0 μM

例 10

基質としてアミノ酸エステル (50 mM) および求核試薬として L-アミノ酸アミド (0.8 M) を用いる pH 8.5 における水中での、ババイヤチオールエンドプロテアーゼ β 触媒し、L-ジペプチドアミドの合成

試薬	基質	添加試薬	生成物	収率
バイキン	LysOEt	AlaNH ₂	LysAlaNH ₂	60%
バイキン	LysOMe	AlaNH ₂	LysAlaNH ₂	55%
キモバイキン	LysOEt	AlaNH ₂	LysAlaNH ₂	23%
キモバイキン	LysOMe	AlaNH ₂	LysAlaNH ₂	34%

a) 100 μM, 2 mM EDTA, 10 mM ヒスチジン

例 1-1

基質としてL-アルギニンエチルエステル(50 mM)および求核試薬としてL-アミノ酸アミドを用いるpH 8.5でのクロストリバインの触媒し、L-ジペプチドアミドの合成

添加試薬	(M)	收率	生成物	収率
L-メチオニニアミド	(0.5 M)	水	AraMetNH ₂	25%
L-フェニルアラニニアミド	(0.2 M)	DMEOH	AraPheNH ₂	8%
L-フェニルアラニニアミド	(0.6 M)	DMDMP	AraPheNH ₂	65%

a) 5 mM 酸、50 mM CaCl₂、10 mM DTT、MSATEAと同様例 1-2

基質としてL-アミノ酸エチルエステル(50 mM)および求核試薬としてL-アミノ酸アミドを用いる30% EtOH中pH 8.5でのブタ脾臓リバーゼの触媒し、L-ジペプチドアミドの合成

基質	添加試薬	(M)	生成物	収率
L-TrpOEt	L-MetNH ₂	(1.5 M)	TrpMetNH ₂	75%
L-TrpOEt	L-MetNH ₂	(1.0 M)	TrpMetNH ₂	54%
L-TyrOEt	L-SerNH ₂	(1.5 M)	TyrSerNH ₂	89%
L-MetOEt	L-MetNH ₂	(1.0 M)	MetMetNH ₂	31%

a) 500 μM

b) 液体水での反応

c) 不完全な変換において

例 1-3

基質としてL-アミノ酸エチルエステル(50 mM)および求核試薬としてL-アミノ酸アミドを用いる30% EtOH中pH 8.5でのCandida Cylindracea リバーゼの触媒し、L-ジペプチドアミドの合成

基質	添加試薬	(M)	生成物	収率
L-TrpOEt	L-MetNH ₂	(1.5 M)	TrpMetNH ₂	75%
L-TrpOEt	L-SerNH ₂	(1.0 M)	TyrSerNH ₂	50%

a) 100 μM、長時間反応

b) 50%未満の変換での付加水分解

例 1-4

L-トリブトファニルメチオニニアミド
TrpMetNH₂の調製的合成

分解後次のような結果が得られた。

Met (1.00)

Trp (1.00)

ナトリウムD標準を用いた50% MeOH、c = 0.2における比旋光度は20°Cで+40.0°であった。

純度

HPLC - 純度: 92.4% (Novapak 4 μm C-18, 0.1Mリン酸アンモニウム、pH 3.0/Aセトニトリル、220 nm)

カールフィッシャーによる水含量: 5.3%

(w/w)

トリニトロベンゼンスルホン酸との反応およびUV-検出によるα-アミノ基の定量: 75.8% (w/w)

UV-定量によるペプチド含量: 88.3% (w/w) (281 nm, MeOH: 0.1N KOH (1:1) 中 Trp 吸収)

例 1-5

L-D-チロシルセリンアミド、TyrSerNH₂の調製的合成

操作

L-チロシンエチルエステル塩酸塩(2.5 g, 1.0ミリモル)とD-セリンアミド塩酸塩(17.5 g, 1.00ミリモル)を水200 mlに溶解し、pHを水酸化ナトリウムで8.5に調整した。反応は50 mlのα-キモトリブシンを添加して開始させ、反応期間中pHを8.5に

操作

L-トリブトファンエチルエステル塩酸塩(4.0 g, 1.5ミリモル)とL-メチオニニアミド塩酸塩(5.5 g, 7 g, 3.00ミリモル)を水195 mlとエタノール90 mlに溶解し、pHを水酸化ナトリウムで8.5に調整した。反応は0.8 gの粗製ブタ脾臓リバーゼを加えて開始させ、反応期間中pHを8.5に保持した。5時間後に基質の残部(4.0 g, 1.5ミリモル)を加え、反応を一夜継続させた。ついでHCl水溶液でpHを3に調整して反応を停止させた。

混合物を次に希釈し、エタノールを減圧下に蒸発させて除去し、混合物を通過した。滤液を、60 μm C-18粒子を充填した2本のカラム(5.7 × 30 cm)と溶出液として5 mM HCl/エタノール混合物を用いたRP-HPLC (Waters Prep LC/System 500 A)によって精製した。

純粋な生成物を含む分画を集め、減圧下に濃縮し、最後に凍結乾燥した。

この操作でL-トリブトファンメチオニニアミド塩酸塩4.78 g(12.9ミリモル, 43%)が無定形の粉末として得られた。

固定

生成物は、塩素10.3% (w/w)を含有する塩酸塩として固定された。

アミノ酸分析では基質のアミノ酸は存在せず、酸加水

特表平4-501056 (11)

維持した。30分後に遊離チロシンの沈殿が始まった。高質の粗部(5.0g、20ミリモル)を1時間内に2.5gずつ2部に分けて加えた。反応液を2時間攪拌したのち、HCl水溶液でpHを3に調整して反応を停止させた。

生成したチロシンを濾過し、濾液を20μm C-18粒子を充填した2本のカラム(5.7×30cm)と溶出液として60μM酢酸を用いたRP-製造HPLC(Waters Prep LC/System 500A)によって精製した。

純粋な生成物を含有する分画を集め、減圧下に濃縮し、最後にHCl水溶液を加えて凍結乾燥した。

この操作により、L,D-チロシルセリンアミド塩酸塩2.8g(9.2ミリモル、31%)が無定形の粉末として得られた。

固定

この生成物は、塩素16.0%(w/w)を含む塩酸塩として同定された。

アミノ酸分析では、遊離のアミノ酸は存在しないことが示され、酸加水分解後には次の結果を与えた。

Ser(1.10)

Tyr(0.80)

ナトリウムD線を用い、50%MeOH中c=0.3での比旋光度は20℃で+58.0°であった。

純度

HPLC-純度: 97.4% (Novapak 4μm C-

塩酸塩2.50g(7.6ミリモル、54%)が無定形粉末として得られた。

固定

生成物は、塩素9.8%(w/w)を含有する塩酸塩として同定された。

アミノ酸分析では遊離アミノ酸の存在は認められなかつたが、酸加水分解後には以下の結果を与えた。

Tyr(0.98)

Leu(1.03)

ナトリウムD線を用いた水中、c=0.1での比旋光度は20℃で-128.4°であった。

純度

HPLC-純度: 92.9% (Novapak 4μm C-18、0.1Mリン酸アンモニウム、pH3.0/Aセトニトリル、220nm)

カールフィッシャーによる水含量: 6.8% (w/w)

トリニトロベンゼンスルホン酸との反応およびUV-検出によるα-アミノ基の定量: 74.9%

UV-定量: 74.9% (0.1M KOH中293nmにおけるチロシンフェノレートの吸収)

例17

L,L-アルギニルメチオニンアミド、
ArgMetNH₂の調製的合成

操作

1.8, 0.1Mリン酸アンモニウム、pH3.0/Aセトニトリル、220nm)

カールフィッシャーによる水含量: 1.8% (w/w)

トリニトロベンゼンスルホン酸との反応およびUV-検出によるα-アミノ基の定量: 81% (w/w)

例18

D,L-チロシルロイシンアミド、
tyrLeuNH₂の調製的合成

操作

D-チロシンエチルエステル塩酸塩(3.5g、1.4ミリモル)およびL-ロイシンアミド塩酸塩(1.4g、8.4ミリモル)を0.1M KOH 24.8mlに溶解し、水酸化ナトリウムでpHを9.0に調整した。反応はα-キモトリプシン0.7gを添加して開始させ、室温で2日間攪拌した。反応期間中pHは9.0に維持した。

HCl水溶液を用いてpHを3に調整して反応を停止させた。

生成したチロシンを濾過し、濾液を、20μM C-18粒子を充填した2本のカラム(5.7×30cm)および溶出液として5mM HClを用いるRP-製造HPLC(Waters Prep LC/System 500A)によって精製した。

純粋な生成物を含有する分画を集め、減圧下に蒸発させて濃縮し、最後に凍結乾燥した。

この操作により、D,L-チロシルロイシンアミド塩

L-アルギニンエチルエテル二塩酸塩(4.1g、1.5ミリモル)およびL-メチオニンアミド塩酸塩(5.5g、4.8g、300ミリモル)を水300mlに溶解し、水酸化ナトリウムでpHを8.5に調整した。反応はトリプシン50mgの添加により開始した。反応期間中pHは8.6に維持した。ついでpHをHCl水溶液によって3に調整して反応を停止させた。

反応混合物を次に希釈し、DOWEX A 650 WX 4およびCM-Sephadex G Bカラム上、それぞれ酢酸アンモニウムおよびNaCl/HCl塩勾配を用いる連続陽イオン交換によって精製し、最終的に脱塩した。

純粋な生成物を含む分画を集め、減圧下に濃縮し、最後に凍結乾燥した。

この操作により、L,L-アルギニルメチオニン二塩酸塩10.7g(28.3ミリモル、63%)が、白色の無定形粉末として得られた。

固定

0.2% (w/w) 朱渦の酢酸および22.9% (w/w) の塩素が測定され、生成物は二塩酸塩として存在した。

アミノ酸分析では、遊離アミノ酸の存在は認められなかつたが、加水分解後には以下の結果が得られた。

Arg(1.00)

Met(0.80)

ナトリウムD線を用いた50%MeOH中c=0.2

での比旋光度は20°Cにおいて+19.5°であった。

例題

HPLC - 濃度: 0.5, 1% (Novapak C-18, 0.1Mリン酸アンモニウム、アルキルスルホネート含有、pH4.5/アセトニトリル、220nm) カールフィッシャーによる水含量: 9.1% (w/w)

アミノ酸分析によるペプチド含量: アルギニンに基づいて7.2% (w/w)

例 1-8

基質としてL-メチオニンエチルエステル、求核試薬としてL-メチオニンアミドを用いる水中および水/有機溶媒均一混合物中pH8.5での、Eupergit C固定化ブタ酵素リバーゼの触媒、L-メチオニルメチニンアミドの合成

濃度	基質	求核試薬	%	有機溶媒	收率	
					50mM	1.0M
			0	-	68%	
			30	イソプロパノール	28%	

a)ブタ酵素リバーゼをEupergit C上に、製造販賣者の推奨する操作に従い、活性アッセイでゲル上の約400μMに相当する最終濃度になるように固定化した。

b)酵素ゲルを充填したカラム上に1~3反応ベッド容量の容量で反応混合物を、HPLCで測定して基質が完全に変換するまで(0.5~2日間)再循環させ、この間pHはpH-スタット制御によって一定に維持した。

例 1-9

純粋な有機溶媒中、基質としてL-トリブトファンエチルエステル(5.0 mM)および求核試薬としてL-アラニン-三級ブチルエチル(0.3 M)をいずれも塩を含まない形で用いるブタ酵素リバーゼおよびα-キモトリブシンの触媒、L-トリブトファンルーラニン-三級ブチルエチルの合成

酵素*	溶媒	交換**	収率**
PPL	CH ₃ Cl ₂ /n-ヘキサン(1:3)	3.0%	1.3%
CT	CH ₃ Cl ₂ /n-ヘキサン(1:3)	5.6%	1.7%
PPL	CH ₃ Cl ₂	7%	1.0%
CT	CH ₃ Cl ₂	5.0%	3.4%
PPL*	CH ₃ Cl ₂ /インソクタン(1:1)	8.2%	2.6%

a)500~2000μMの水分含有、凍結乾燥酵素を混合物に直接加え、これを24時間攪拌した。

b)この場合は、酵素500μM、反応時間3日を適用した。

c)出発原料の交換率と生成対加水分解は、DMFで反応を停止し、蒸発させ、DMF/酸性水中に再溶解したサンプルのHPLCで測定した。対照は交換も生成も示さなかった。

例 2-0

基質としてL-チロシンまたはL-フェニルアラニンエチルエステル(5.0 mM)および求核試薬としてL-S-アセトアミドメチルシスティンアミド(0.8 M)を用いるpH8.5における水中での、α-キモトリブシンの触媒、側鎖保護し、L-ジペプチドの合成

基質	生成物	收率
L-チロシンエチルエステル	TyrCys(-SAc) ₂ NH ₂	62%
L-フェニルアラニンエチル	PheCys(-SAc) ₂ NH ₂	78%

a) 5μM例 2-1

基質としてL-チロシンおよびL-フェニルアラニンエチルエステル(5.0 mM)および求核試薬としてL-アミノ酸アルコール(0.5 M)を用いるpH8.5における水中での、α-キモトリブシンの触媒、L-ジペプチドアルコールの合成

基質	求核試薬	生成物	收率
L-TyrOEt	L-MetCH ₂ OH	TyrMetCH ₂ OH	42%
L-TyrOEt	L-LeuCH ₂ OH	TyrLeuCH ₂ OH	46%
L-PheOEt	L-MetCH ₂ OH	PheMetCH ₂ OH	60%

a) 1.0 μM例 2-2

基質としてアミノ酸エチルエステル(5.0 mM)および求核試薬として避難L-アミノ酸を用いる、pH8.5における水中での、チオールエンドプロテアーゼの触媒、L-ジペプチドの合成

特表平4-501056 (13)

酵素	基質	求核試薬	(濃度)	生成物	収率 ^{a)}
フィシン	ArgOEt	ArgOH	(1. 0M)	ArgArgOH	6%
ババイン	ArgOEt	ArgOH	(1. 0M)	ArgArgOH	7%
フィシン	LysOEt	AlaOH	(1. 0M)	LysAlaOH	5%
ババイン	LysOEt	AlaOH	(1. 0M)	LysAlaOH	6%

a) 100 μM, 2 mM EDTA, 0.1M KCl, 5 mM DTT, 10 mM

システィン

b) 変換率 50% 未満で、標準によって加水分解に対して測定

c) 酵素のない対照は、上述の条件下では加アミノ分解は検出できなかった。

例 2-3

基質としてアルギニン-バラニトロアニリド (1.0 mM) および求核試薬として L-アミノ酸アミド (0.3 M) を用いる、pH 8.5 における 40% DMF 中での、トリプシン⁺⁺触媒、L, L-ジグペプチドアミドの合成

求核試薬	生成物	収率 ^{b)}
メチオニニアミド	ArgMetNH ₂	45%
ロイシンアミド	ArgLeuNH ₂	31%
チロシンアミド	ArgTyrNH ₂	14%

a) 5 μM

b) 変換率 80% 未満で、標準により加水分解に対して測定

例 2-4

基質として L-リシンエチルエステル (5.0 mM) および求核試薬として L-アラニニアミド (0.8 M) を用いる、様々な pH の水中での、ババイン⁺⁺触媒、L, L-リジルアラニンの合成

pH	収率 ^{c)}
8.5	21%
4.5	47%

a) 50 μM, 2 mM EDTA, 10 mM システィン

b) 長時間反応：変換率 50% 未満

c) 標準を用いて加水分解に対して測定し、不完全な変換について補正した。

例 2-5

基質として L-アミノ酸エチルエ斯特ル (5.0 mM) お

よび求核試薬として L-アミノ酸エチルまたは三級ブチルエ斯特ルを用いる、pH 7.5 および 8.5 における水中での、α-キモトリプシン⁺⁺およびクロストリパイン⁺⁺触媒し、L-ジグペプチドエ斯特ルの合成

酵素	基質	求核試薬	(濃度)	生成物	収率
CT	TrpOEt	AlaOtBu	(0.8M)	TrpAlaOtBu	12%
CT	TrpOEt	ValOEt	(0.8M)	TrpValOEt	18%
CL	ArgOEt	MetOEt	(1.0M)	ArgMetOEt	33%

a) 5 μM, 0.1M KCl, pH 7.5

b) 10 μM, 50 mM CaCl₂, 10 mM DTT, TGA で pH 8.5 に調整

c) 変換率 50% 未満で測定

例 2-6

基質として様々な L-メチオニニアミドおよび求核試薬として L-メチオニニアミドを用いる、様々な水／有機溶媒均一混合物中、pH 8.5、とくに指示のない限り求核試薬 L, 0 M における、ブタ脾臓リバーゼ⁺⁺および Lipolase (Novo)(LIP)⁺⁺および Rhizopus Arrhizus リバーゼ (RA)⁺⁺触媒、L, L-メチオニル-メチオニニアミドの合成

基質	酵素	エ斯特ル	(濃度)	%	有機溶媒	収率 ^{c)}
PPL ⁺⁺	エチル	(50 mM)	0	-	-	55%
PPL ⁺⁺	エチル	(50 mM)	0	-	-	36%
PPL	エチル	(150 mM)	0	-	-	42%
PPL	エチル	(200 mM)	15	ジメトキシエタン	-	20%
PPL	エチル	(150 mM)	30	イソプロパノール	-	36%
PPL	エチル	(50 mM)	90	エチレングリコール	-	42%
PPL	ローブロビル	(50 mM)	0	-	-	55%
PPL	ローヘキシル	(50 mM)	0	-	-	38%
LIP	エチル	(50 mM)	0	-	-	47%
LIP	エチル	(50 mM)	15	ジメトキシエタン	-	35%
LIP	ローヘキシル	(50 mM)	0	-	-	32%
RA	エチル	(50 mM)	30	エタノール	-	23%

a) 1000 μM ~ 2000 μM

b) 50 μM

c) pH 9.0

d) 0.25M 求核試薬

e) これらの条件下では、量的に変動する少量の脱アミド生成物が認められたが、記載した収率には含まれていない。

例 2-7

基質として L-チロシンエチルエ斯特ルおよび求核試薬としてグリシンアミドを用いる、水中での、

Trichoderma Viridae セルラーゼ酵素、し、L-Tyr
GlyNH₂ の合成

基質	(測定) 活性試験	(測定)	生成物	収率%
TyrOEt ² (2mm)	GlyNH ₂	(0. 8M)	TyrGlyNH ₂	23%
TyrOEt ² (1mm)	GlyNH ₂	(0. 8M)	TyrGlyNH ₂	34%

- a) 1000 μM 酵素液、pH8.5
 b) 500 μM 酵素液、pH8.0
 c) 変換率30% 水滴で加水分解に対して測定し、同一条件下における対照に認められた加水分解および加アミノ分解に対して補正した。

特表平4-501056 (14)

補正書の翻訳文提出書 (特許法第184条の8)

平成 3 年 2 月 8 日

特許庁長官 殿

1. 特許出願の表示 PCT/JP89/00193

2. 発明の名稱 ジペプチドまたは構造関連化合物の酵素的製造方法

3. 特許出願人

住所(居所) デンマーク国 ティケイー 2200 コペンハーゲン エヌ
タサンスベユ 16

氏名(名跡) カールバイオテック リミテッド アクティーセルスカブ

4. 代理人

固 所 〒100 東京都千代田区大手町二丁目2番1号
新 大 手 町 ビ ル デ ン グ 331
電 話 (3211) 3661 (代表)

氏 名 (6689) 石井 栄一



5. 補正書の提出年月日 1990年3月9日



6. 提出書類の目録 補正書の翻訳文 1通

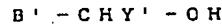
明細書

ジペプチドまたは構造関連化合物の酵素的製造方法

本発明は、一般式



(式中、Aは側鎖が保護されていてもよいL-もしくはD-α-アミノ酸残基またはD-β-アミノ酸残基であり、BはAと同様もしくは異種の側鎖が保護されていてもよいL-もしくはD-α-アミノカルボン酸残基、およびL-もしくはD-アミノリン酸残基またはL-もしくはD-アミノスルホン酸残基、または相当するD-アミノ酸、またはそれらの塩もしくは水和物であり、YはOH、H、アルキル、アリール、アラールキルまたはC-末端保護基であり、ただしBがPhe、Yがアルキルである場合にはAはAspまたはGluではなく、あるいはB Yは



チとは基本的に異なり、アスパルテームに特異的な生物体によるものである。したがって、一般的に他のジペプチドに適用して適用できるものではない。さらに、収率は低く、発酵培地からの回収には労力を要する。

アスパルテームの既知の製造方法における上述の短所はEP-A 2-269390に述べられている。この出願には、溶媒中でL-アスパルギン酸α-エステルまたはL-アスパラギン酸β-アミドをL-フェニルアラニンアルキルエステルと、酵素、その酵素を含有する微生物、微生物の酵素含有分画、または固体支持体上に固定化された酵素の存在下に反応させるL-Asp-L-Phen-アルキルエステルが請求されている。この酵素は、L-アスパラギン酸α-エステルまたはL-アスパラギン酸β-アミドとL-フェニルアラニンアルキルエステルの結合によりL-アスパルチル-L-フェニルアラニンアルキルエステルを生成できるものである。

者の保護基の回収を可能にすることは、全過程の経済性という意味で明らかに有利である。側鎖に保護基をもつが末端には保護基をもたないジペプチドを製造できることに興味がもたれる場合もあり、これは、側鎖は保護されているがアミノ基は保護されていない出発原料に出発する本発明の方法において示される。この場合、緩和な反応条件と全過程の経済性の同じ利点が得られる。所望により、側鎖保護基は、一般的に、アミノ保護基の場合よりも緩和な条件下に、化学的または酵素的手段で除去できる。

側鎖が保護されていなくてもよいアミノ酸誘導体とC-末端が保護されていなくてもよいB-成分(求核試薬)の使用が可能な酵素触媒カップリング反応も知られている。たとえば、DK特許明細書第155613号ならびに相当EP特許明細書第17485号(EP-B1-17485)に記載されている。この記載は参考として本明細書に導入する。

れているようにアスパラギン酸エンドプロテアーゼたとえばペプシンを使用する場合、EP-A1-009585にZ-Asp-PheOMe、PheOMe-基の合成によって例示されているようにメタロエンドプロテアーゼを使用する場合にも必須である。

EP-A2-209430に例示されているレーアミノ酸とD-アミノホスホン酸との酵素的結合は同様に、基質成分としてN- α -保護アミノ酸、たとえばBOC-Ala、BOC-LeuまたはBOC-Pheを過剰カルボン酸型で使用するものである。

アミノおよびカルボキシ末端保護出発原料の使用は、非プロテアーゼたとえばアミダーゼ活性をもつエステラーゼについても必須と考えられていた。Blair Westら(Tetrahedron Letters, 28 (15): 1829~32, 1987)による、水性緩衝液を含んでいてもよい有機媒中にでのブタ脾リバーゼ、Candida cylindraceaリバーゼおよびブタ肝エステラーゼの使用例がある。

一方、セルラーは、Kitazume, T.ら(J. Flavour Chem., 38: 225~236, 1987)によって記載されているように、これまで、完全に過剰のD-アミノ酸の重合複合型反応に合成的に使用されたことがあるにすぎない。

いが、基質成分のアミノ基保護が必須と考えていることは明白である。

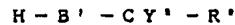
EP-A1-278787の発明をさらに発展させた本発明は、ジペプチドおよびジペプチド誘導体の合成のための創画された反応における基質成分としてのN- α -非保護アミノ酸エステルおよびアミドの利用可能性がセリンまたはチオールカルボキシペプチダーゼに限られるものではなく、一般にアミダーゼまたはエステラーゼ、とくにセリンエンドプロテアーゼ、チオールエンドプロテアーゼ、リバーゼおよびエステラーゼによっても可能であるという驚くべき所見に基づくものである。

さらに、驚くべきことに、これらの反応における基質としてはD-コンフィギュレーションのN- α -非保護アミノ酸誘導体も使用でき、したがってL-ジペプチドのほかにD-L-ジペプチドも合成できることが見出された。しかしながら、D-基質についての反応速度は一般に、均一条件下では、L-基質についての

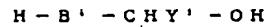
(式中、Bは先に定義したようにアミノカルボン酸残基であり、R'はアルキル、アリールまたはアラールキルである)を有するアミノ酸エステル、(d)式



(式中、R'、R'およびR''はそれぞれ独立に水素、アルキルまたはアラールキルを表し、xは1~6である)を有する酸基が保護されていてもよい直鎖状または分岐状アミノホスホン酸またはアミノスルホン酸、(e)式



(式中、B'は先に定義した通りであり、Y'はOまたはその官能性誘導体、好みしくはケタールであり、R''はH、アルキル、アリールまたはアラールキルである)を有するアミノ酸アルデヒドもしくはケトンまたはその誘導体、および(f)式



(式中、B'およびY'は上述の意味を有する)

特表平4-501056 (16)

e) これらの条件下では、量的に変動する少量の脱アミド生成物が認められたが、記載した收率には包含されていない。

例 2.7

基質としてL-チロシンエチルエステルおよび求核試薬としてグリシンアミドを用いる、水中での、
Trichoderma Viride セルラー酵素、L, L-Tyr-Gly-NH₂の合成

基質	(測定) 求核試薬	(測定)	生成物	收率
TyrOEt ²⁺ (2.0M)	GlyNH ₂	(0. 6M)	TyrGlyNH ₂	23%
TyrOEt ²⁺ (1.0M)	GlyNH ₂	(0. 6M)	TyrGlyNH ₂	34%
TyrOIPr ²⁺ (1.0M)	AlaNH ₂	(1. 6M)	TyrAlaNH ₂	52%

- a) 1000 μM 粗酵素、pH8.5
- b) 500 μM 粗酵素、pH8.0
- c) 変換率30%未満で加水分解に対して測定し、同一条件下における対照に認められた加水分解および加アミノ分解に対して補正した。
- d) 使用した条件下では完全な酵素的変換が認められ、自然変換はみられなかった。

例 2.8

基質としてチロシンエチルエステル(5.0 mM)および求核試薬として様々な α -アミノカルボン酸エストルを用いる、3.0% DMF中pH 8.5での、セリンエンドプロテアーゼ²⁺触媒、 α -アミノ酸含有ジペプチドの合成

試薬	求核試薬	濃度	生成物	收率
D-Tyr-OEt	L-Arg-OH	1.0M	D,L-TyrArgOH	11%
D-Tyr-OEt	L-Glu(OEt) ₂ OEt	0.5M	D,L-TyrGlu(OEt) ₂ OEt	23%
D-Tyr-OEt	L-Glu(OEt) ₂ OEt	0.5M	L-L-TyrGlu(OEt) ₂ OEt	4%

a) 500 μM 市販等級の酵素

b) 長時間反応一日単位

例 2.9

基質としてL-チロシンエチルエステル(2.5 mM)および求核試薬として様々な α -アミノカルボン酸エストルを用いる、3.0% DMF中pH 8.5での、セリンエンドプロテアーゼ²⁺触媒、 α -アミノ酸含有ジペプチドの合成

試薬	求核試薬	濃度	生成物	收率
キモトリプシン	B-Ala-OEt	1. 5M	L-Tyr-BAlaOEt	4%
ズブトリシン	B-Ala-OEt	1. 5M	L-Tyr-BAlaOEt	7%
キモトリプシン	GABA-OEt ²⁺	1. 5M	L-Tyr-GABAOEt	4%
ズブトリシン	GABA-OEt ²⁺	1. 5M	L-Tyr-GABAOEt	4%

a) 20 μM

b) BABA = γ -アミノ酸酸

例 3.0

中間体L, L-トリプトファンエチルエスチル塩酸塩、TyrVal-OEt²⁺を基とするL, L-トリプトファンエチルバリン、TyrVal-OHの調製的製造

操作

L-トリプトファンエチルエスチル塩酸塩(8. 0 g、30ミリモル)とL-バリンエチルエスチル塩酸塩(8. 5. 4 g、38. 0ミリモル)を水300 mlに溶解し、水酸化ナトリウムでpHを8. 5に調整した。反応は α -キモトリプシン7.5 mgを添加して開始させ、反応期間中、室温、一定のpHで4.5分間攪拌した。ついでHCl²⁺溶液を用いてpHを3に調整して反応を停止させた。

次に溶液を滤過し、滤液を、5.0 μM C-18粒子を充填した2本のカラム(5. 7 × 30 cm)を用い、溶出液は5 mM HCl²⁺のアルコール濃度を上昇させていくRP-HPLCによって精製した。

純粋な生成物を含む分画を集め、減圧下に蒸発させて濃縮し、最後に凍結乾燥した。

この操作により、L, L-トリプトファンエチルバリンエチルエスチル塩酸塩(1. 70 g(4. 8ミリモル、1.5%)が無定形の粉末として得られた。

かくして得られたジペプチドエスチルを水20 mlに再溶解し、pHを6. 5に調整した。ブタ肝臓エスチラーゼ(EC 3. 1. 1. 1)20 mgを含有する懸濁液2 mlを次に加え、反応液を一定のpHで一夜攪拌し、澄明な反応

液が生成したのち、pHを3に調整した。

1.5 μM C-18 RPカラム(2. 5 × 25 cm)を用い、5.0 mM HOAcのアルコール濃度を増大させて溶出して、混合物を脱塩した。

純粋な生成物を含む分画を集め、減圧下に蒸発させて濃縮し、最後に凍結乾燥した。

この操作により、L, L-トリプトファンエチルバリン(1. 28 g(4. 2ミリモル、9.2%)が無定形の粉末として得られた。

TyrVal-OH-分析データ

同定

生成物はアセテート含量4. 0%(w/w)であった。塩漬は検出できなかった。

アミノ酸分析では遊離アミノ酸は存在しなかったが、疎加水分解後に以下の結果が得られた。

Val(1. 00)

Tyr(1. 00)

ナトリウムD線を用い20°Cで測定した1%HOAc中、c=0. 01における比旋光度は+26. 1°であった。

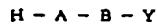
純度

HPLC-純度: 9.8. 7%(Novapak 4 μm C-18. 0. 1Mリン酸アンモニウム、pH3. 0. 1アセトニトリル、220 nm)

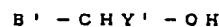
カール・フィッシャーによる水含量: 5%(w/w)

UV-定量: 8.6% (0.1N KOH 中 28.0 ml において)

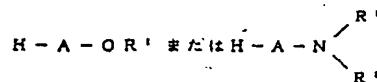
1. 一般式



(式中、Aは側鎖が保護されていてもよいし、もしくはD-α-アミノ酸残基またはL-アミノ酸残基であり、BはAと同様もしくは異性の側鎖が保護されていてもよいし、もしくはD-α-アミノカルボン酸残基、およびL-アミノリシン残基またはL-アミノスルホン酸残基、または相当するL-アミノ酸、またはそれらの塩もしくは水和物であり、YはOH、H、アルキル、アリール、アラールキルまたはC-末端保護基であり、ただしBがPhen、Yがアルキルである場合にはAはAspまたはGluではなく、あるいはBYは



(式中、B'はBに隣接して定位されたアミノカルボン酸のデカルボキシ誘導体であり、Y'はH、アルキル、アリールまたはアラールキルである)で示されるアミノアルコール残基を表す)を有するジペプチドまたは構造的に類縁の化合物を製造するにあたり、式



(式中、Aは上に定義したとおりであり、R'は不活性置換基で置換されていてもよいアルキル、アリールもしくはアラール基であるかまたはアミノ酸のα-deamino-

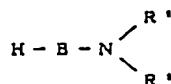
アミノフラグメントであり、R'およびR'は互いに同種または異性でありそれぞれ水素または不活性置換基で置換されていてもよいアルキル、アリールもしくはアラールギル基である)を有するアミノ酸誘導体である基質成分を、

(a) 式



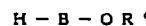
(式中、Bは上に定義したようにアミノカルボン酸残基である)を有するアミノ酸。

(b) 式



(式中、Bは上に定義したようにアミノカルボン酸残基であり、R'およびR'は、R'が水素である場合にはR'はヒドロキシまたはアミノでもよいことを除いて、上記の意味を有する)を有するアミノ酸アミド。

(c) 式



(式中、Bは上に定義したようにアミノカルボン酸残基であり、R'はアルキル、アリールまたはアラールキルである)を有するアミノ酸エステル。

(d) 式



(式中、R'、R'およびR'はそれぞれ独立に水素、アルキル、アリールまたはアラールキルであり、xは1~6である)を有する、酸基が保護されていてもよい直鎖状または分岐状アミノカルボン酸またはアミノスルホン酸。

国際調査報告

International Application No. PCT/OK89/00193

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER OF INTERNATIONAL APPLICATION	
According to International Patent Classification (IPC) or to their National Classification and IPC	
C 12 P 21/02, C 07 X 1/00	
II. FIELDS SEARCHED	
International Classification Searcher / Classification Searcher	
Classification Searcher	
IPC 4 C 07 X 1/00-1/14; C 12 P 21/00, /02	
US CL A33;68-70; 19214, 29, 30	
Other classification (other than International Classification Searcher) to the extent that such documents are included in the Patent Database:	
SC, NO, OK, FI classes as above.	
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT	
Category 1: Citation of Document, "use reference, name, address, of the relevant document" / Reference to Citation No. V	
Y	EP, A2, 0 269 390 (GENENCOR INC.) 1 June 1988 see page 2 lines 33-60
Y	EP, A2, 0 220 923 (W.R. GRACE & CO) 6 May 1987 see claim 1 A EP, 86308176 US, 4710583 US, 6810817 JP, 62142199
Y	EP, A1, 0 074 095 (TOYO SODA MANUFACTURING CO., LTD) 14 March 1983 A EP, 82108117 JP, 58043793 US, 4506011 CA, 1193272 JP, 58063394
.......	
<p>* I passed an opinion of cited documents. ** I considered whether the present subject of the application is the same as the subject matter of the cited documents. *** either documents are published or after the international filing date. **** either documents are issued or issued before the international filing date. ***** either documents are issued or issued after the international filing date. **** documents relating to art and substances, non-chemical or chemical. ***** documents relating to the improvement of living cells and other living things (including microorganisms) </p>	
<p>† later amendment performed after the international filing date ‡ later amendment performed before the international filing date § either documents are published or after the international filing date. either documents are issued or issued before the international filing date. documents of industrial property, the present invention is not concerned with the protection of industrial property. documents of industrial property, the present invention has been concerned with the protection of industrial property. documents of industrial property, the present invention has been concerned with one or more other than the protection of industrial property. documents of industrial property, the present invention has been concerned with one or more other than the protection of industrial property being performed by a person other than the inventor. documents number of the same patent family </p>	
IV. CERTIFICATION	
Date of the Actual Examination in the International Bureau	Date of Mailing of the International Search Report
1989-10-13	1989-11-14
International Searching Authority	International Examining Authority
Swedish Patent Office	Yvonne Sjödén

Form PCT/1989/00193 (Japanese Version) 1989

II. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)		
Category	Citation of Document, with reference, name, address, of the relevant document	Remarks on Citation No.
Y	EP, A2, 0 138 472 (AJIMOMOTO CO., INC.) 11 September 1983 A EP, 85301229 US, 4666838 JP, 61033796	1-14
Y	EP, A1, 0 017 483 (DE FORENEDE BRUGGERIER A/S) 19 October 1980 see page 5, lines 1-5, pages 6-7 and the claims A WO, 80/02137 US, 4332714 US, 1450973 AT, E, 5993 CA, 1117819 AU, 545416 US, 4806473	1-14
P,I	EP, A1, 0 270 787 (CARLSBERG BIOTECHNOLOGY LTD, A/S) 17 August 1988 A WO, 88/08187	1-14

Form PCT/1989/00193 (Japanese Version) 1989

第1頁の続き

②発明者 ウィドマー, フレッド

デンマーク国ディーケイ — 2200 コペンハーゲン エヌ. タグ
ンスベユ 16, カールバイオテック リミテッド アクティーゼル
スカブ 気付

②発明者 ハンセン, ソレン

デンマーク国ディーケイ — 2400 コペンハーゲン エヌブイ,
トムスガールドスベユ 102